

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **11106400 A**

(43) Date of publication of application: **20 . 04 . 99**

(51) Int. Cl.

C07K 16/28
A61K 39/395
A61K 39/395
C12N 5/10
C12P 21/08
// C12N 15/02
(C12N 5/10 , C12R 1:91), (C12P
21/08 , C12R 1:91)

(21) Application number: **09266591**

(22) Date of filing: **30 . 09 . 97**

(71) Applicant: **JAPAN TOBACCO INC**

(72) Inventor:
AOKI RYOKO
HIRANO DAISUKE
NAKAMURA MOTONAO
NISHI YOSHISUKE

(54) **ANTIBODY CONTAINING GRANULOCYTE
COLONY-STIMULATING FACTOR INDUCTION
ACTIVITY AND ITS MEDICINE**

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject new antibody comprising an antibody having granulocyte colony stimulating factor(G-CSF) induction activity or its part, having G-CSF production ability, useful as a preventive, a therapeutic agent, etc., for adverse effects of anti-cancer agent, opportunistic infectious disease, etc.

SOLUTION: This antibody or its part has granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) induction activity, G-CSF production ability dependently upon concentration,

shows treating effects on neutropenia and neutropenia after bone marrow transplantation and apastic anemia and is useful for preventing and treating various infectious diseases including opportunistic infection, etc. The antibody is obtained by administering mouse macrophage cell strain RAW 264.7 as an immunization antigen to an MRL/1 pr mouse by intraperitoneal administration four times at intervals of 7 days, collecting a splenocyte after the final immunization, fusing the splenocyte with a mouse myeloma cell, selecting a strain to produce a macrophage cell binding antibody from the obtained hybridoma and culturing the strain.

COPYRIGHT: (C)1999,JPO

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平11-106400

(43)公開日 平成11年(1999) 4月20日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	F I	
C 0 7 K 16/28		C 0 7 K 16/28	
A 6 1 K 39/395	A B Y	A 6 1 K 39/395	A B Y N
	A D Z		A D Z D
C 1 2 N 5/10		C 1 2 P 21/08	
C 1 2 P 21/08		C 1 2 N 5/00	B
審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 8 頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願平9-266591

(22)出願日 平成9年(1997) 9月30日

(71)出願人 000004569

日本たばこ産業株式会社
東京都港区虎ノ門二丁目2番1号

(72)発明者 青木 良子

神奈川県横浜市青葉区梅が丘6-2 経営
企画部青葉台駐在

(72)発明者 平野 大祐

神奈川県横浜市青葉区梅が丘6-2 経営
企画部青葉台駐在

(72)発明者 中村 元直

神奈川県横浜市青葉区梅が丘6-2 経営
企画部青葉台駐在

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 顆粒球コロニー刺激因子誘導活性を有する抗体及びその医薬

(57)【要約】 (修正有)

【解決手段】 顆粒球コロニー刺激因子の誘導活性を有するモノクローナル抗体、それを産生するハイブリドーマ及び該モノクローナル抗体を含んでなる医薬組成物。

【効果】 上記モノクローナル抗体は、濃度依存的に顆粒球コロニー刺激因子の産生能を有し、抗ガン剤の副作用としての好中球減少症や骨髄移植後の好中球減少症の治療、再生不良性貧血の治療に効果を示す。また、顆粒球コロニー刺激因子を産生させることにより日和見感染症をはじめとする各種感染性疾患の予防又は治療に利用できる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 顆粒球コロニー刺激因子誘導活性を有する抗体又はその一部。

【請求項 2】 抗体がモノクローナル抗体である請求項 1 記載の抗体又はその一部。

【請求項 3】 モノクローナル抗体が国際寄託番号 FERM BP-6103 であるハイブリドーマが産生する抗体である、請求項 2 記載の抗体もしくはその一部。

【請求項 4】 請求項 2 に記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

【請求項 5】 国際寄託番号 FERM BP-6103 であるハイブリドーマ。

【請求項 6】 請求項 1 乃至請求項 3 記載の抗体又はその一部及び薬学的に許容されうる担体とを含んでなる医薬組成物。

【請求項 7】 請求項 1 乃至請求項 3 記載の抗体又はその一部及び薬学的に許容されうる担体を有効成分として含んでなる感染症の予防または治療のための医薬組成物。

【請求項 8】 請求項 1 乃至請求項 3 記載の抗体又はその一部及び薬学的に許容されうる担体を有効成分として含んでなる好中球減少症の予防または治療のための医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) の誘導活性を有するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ、G-CSF の誘導活性を有する抗体及びその一部、該抗体または該抗体フラグメントを含んでなる医薬組成物に関する。

【0002】

【従来の技術】 顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) は、分子量は約 18000 から 22000 で、ヒトの場合 174 個 (まれに 178 個)、マウスで 178 個のアミノ酸で構成されている。血液成分の白血球の一種である好中球の分化増殖を誘導する糖タンパクである。

【0003】 G-CSF は、成熟好中球の生存の延長や機能の亢進作用を有するが、エリスロポエチンによる赤芽球、インターロイキン 3 による芽球コロニーの形成も増強する。このような G-CSF を産生する細胞としては、マクロファージ、ストローマ細胞、単球、T リンパ球、繊維芽細胞、血管内皮細胞などが挙げられる。

【0004】 G-CSF を薬剤として投与することは、抗ガン剤の副作用としての好中球減少症や骨髓移植後の好中球減少症の治療及び再生不良性貧血の治療に効果を示す。しかし、投与時においては、血中安定性が低いために頻回投与を必要とし、しかも投与は静脈投与に限られているために患者、医師の双方に苦痛と負担を強いられてきた。さらに、G-CSF を薬剤として投与すると、副作用として骨痛を起こすことが報告されている。また、G-

CSF を産生する細胞としてのマクロファージやストローマ細胞を直接投与することは、細胞であるために種々のタンパクや様々な物質を含んでいるために思わぬ副作用を起こす可能性があるため、そのような治療は行われていない。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】 上記の如く、G-CSF 自体を投与することによって好中球を分化増殖させる方法では、副作用として骨痛を惹起することばかりでなく、頻回投与が必要であり、患者及び医師にも苦痛と負担を強いられてきたため、他の治療方法の開発が強く要望されているが、未だ確立されていない。

【0006】 そこで、本発明者らは、G-CSF 自体を投与するのではなく、G-CSF を産生させ、好中球を分化増殖させることを考えた。本発明は、G-CSF を産生させる抗体を提供することを課題とする。本発明は、そのような臨床上で G-CSF の誘導剤の誘導に関わる分子の分離及び精製のための試薬として、また医薬品として極めて有用な G-CSF 誘導抗体を提供するものである。

【0007】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、まず、マクロファージ自体を免疫して抗体を取得し、得られた抗体の中から G-CSF を誘導する抗体の単離を行うこととした。以下、具体的に説明する。

【0008】 本発明者らは、まず、マウスマクロファージ細胞株を免疫原として MRL/lpr マウス (自己免疫疾患マウス) に投与し、モノクローナル抗体の単離を行った。次いで、本発明者らは、得られたモノクローナル抗体を、免疫原細胞であるマウスマクロファージ細胞株に作用させ、該抗体の免疫原細胞に与える影響を検討した。この結果、本発明者らは、得られた抗体の一つが免疫原細胞株であるマウスマクロファージ細胞株から濃度依存的に G-CSF を産生させる特性を有することを見出した (以下、この抗体を「3-4H7 抗体」と称する)。

【0009】 即ち、本発明は、マウスマクロファージ細胞株から濃度依存的に G-CSF を産生させる特性を有する抗体、該抗体を産生するハイブリドーマ、該抗体を含んでなる医薬組成物に関する。より具体的には、本発明は、(1) G-CSF 誘導活性を有する抗体又はその一部、例えば、(2) 抗体がモノクローナル抗体である (1) 記載の抗体又はその一部、(3) モノクローナル抗体が国際寄託番号 FERM BP-6103 であるハイブリドーマが産生する抗体である、(2) 記載の抗体もしくはその一部。に関する。

【0010】 また、本発明は、(4) (2) 又は (3) に記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ、例えば、(5) 国際寄託番号 FERM BP-6103 であるハイブリドーマ、に関する。

【0011】 さらに本発明は、(6) (2) 又は (3) 記載のモノクローナル抗体を含んでなる医薬組成

物、例えば、(7) (2)又は(3)記載のモノクローナル抗体を含んでなる感染症の予防または治療のための医薬組成物、又は、(8) (2)又は(3)記載のモノクローナル抗体を含んでなる好中球減少症の予防または治療のための医薬組成物、に関する。

【0012】

【発明の実施の形態】以下、本発明で用いる語句の意味を明らかにすることにより、本発明を詳細に説明する。本発明における「モノクローナル抗体」は、マクロファージ細胞株に反応性を有するモノクローナル抗体であり、具体的には、G-CSFを産生させる作用を有するモノクローナル抗体である。本発明の抗体は、マクロファージ細胞株に実質的に結合するという特性を有する。本発明の抗体は、上記性質を有するポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を共に包含する。また、本発明のモノクローナル抗体には、IgG、IgM、IgA、IgDおよびIgEなるいずれのイムノグロブリンクラスに属するモノクローナル抗体をも包含し、好適には、IgGまたはIgMイムノグロブリンクラスモノクローナル抗体である。

【0013】なお、マクロファージ細胞株は、例えば、自然発生の白血球細胞から調製したり、白血球ウイルスによる形質転換から調整することが可能である。本発明の抗体は常法（例えば、文献「続生化学実験講座5、免疫生化学研究法、日本生化学会編：東京化学同人発行、等」に記載の方法）に従って取得することができる。例えば、本発明のモノクローナル抗体は、いわゆる細胞融合によって製造されるハイブリドーマ（融合細胞）から製造することができる。すなわち、抗体産生細胞と骨髓腫系細胞から融合ハイブリドーマを形成し、当該ハイブリドーマをクローン化し、マクロファージ細胞株の全部または一部を抗原として、それに対して特異的親和性を示す抗体を生産するクローンを選択することによって製造される。その操作は免疫抗原としてマクロファージ細胞株の全部または一部を使用する以外は、従来既知の手段を用いることができる。

【0014】免疫抗原は、例えばマクロファージ細胞株そのものを用いるか、マクロファージ細胞株の膜面分若くは溶解抽出液の全部または一部を有する（ポリ）ペプチドの溶液又は例えば完全フロインドアジュバンドとを混和して調製される。免疫の対象として用いられる動物としては、マウス、ラット、モルモット、ハムスターまたはウサギ等の哺乳動物、好ましくはマウスまたはラット、より好ましくはマウスが例示される。免疫は、これらの哺乳動物の皮下内、筋肉内、静脈内、フットパッド内、または腹腔内に1乃至数回注射することにより行われる。通常、初回免疫から約1〜2週間毎に1〜4度免疫を行い、さらに約1〜4週間後に最終免疫を行って、最終免疫より約3〜5日後に免疫感作された動物から抗体産生細胞が採取される。本発明のモノクローナル抗体には、

「国際寄託番号 FERM BP-6103」のハイブリドーマが産

生するモノクローナル抗体（3-4H7抗体）もしくはその一部または該抗体と実質的に同一の性状を有する抗体が含まれる。「3-4H7抗体」は、細胞からのG-CSF産生誘導能を有する。

【0015】また、本発明は、「国際寄託番号 FERM BP-6103」のハイブリドーマに関する。本発明のハイブリドーマは、公知の方法で調製することが可能である。公知の方法としては、例えば、モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマの調製には、ケーラー及びミルシュタインらの方法（Nature, Vol. 256, pp. 495-497, 1975）及びそれに準じる修飾方法が挙げられる。すなわち、本発明のモノクローナル抗体は、前述の如く免疫感作された動物から取得される脾臓、リンパ節、骨髓あるいは扁桃等、好ましくは脾臓に含まれる抗体産生細胞と、好ましくは同種のマウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギまたはヒト等の哺乳動物、より好ましくはマウス、ラットまたはヒトの骨髓腫系細胞（ミエローマ）との融合により得られる融合細胞（ハイブリドーマ）を培養することにより調製される。培養は、インビトロ、またはマウス、ラット、モルモット、ハムスターもしくはウサギ等の哺乳動物、好ましくはマウスまたはラット、より好ましくはマウスの腹水中等でのインビボで行うことができ、抗体はそれぞれ該培養上清、または哺乳動物の腹水から取得することができる。

【0016】細胞融合に用いられる骨髓腫系細胞としては、例えばマウス由来ミエローマ「P3/X63-Ag8」、「P3/NSI/1-Ag4-1」、「P3/X63-Ag8.U1」、「SP2/0-Ag14」、「PAI」、「FO」または「BW5147」、ラット由来ミエローマ「210RCY3-Ag1.2.3」、ヒト由来ミエローマ「U-266AR1」、「GM1500-6TG-A1-2」、「UC729-6」、「CEM-AGR」、「DIR11」又は「CEM-T15」などを挙げることができる。本発明のモノクローナル抗体を産生する融合細胞クローンのスクリーニングは、融合細胞を、例えばマイクロタイタープレート中で培養し、増殖の見られたウェルの培養上清の抗原に対する反応性を、例えば、フローサイトメトリー、RIAやELISA等の酵素抗体法によって測定することにより行うことができる。モノクローナル抗体の精製、単離は、上述のような方法によって取得される本発明のモノクローナル抗体を含有する血清、腹水あるいはハイブリドーマ培養上清をイオン交換クロマトグラフィー（DEAEまたはDE52など）、抗イムノグロブリンカラムあるいはプロテインA若くはプロテインGカラム等のアフィニティークラムクロマトグラフィーに付すること、または、カプロリン酸を添加することにより行うことができる。

【0017】本発明の「モノクローナル抗体」は、上述の製造方法に限定されることなく、いかなる方法で得られたものであってもよい。また、通常「モノクローナル抗体」は、免疫感作を施す哺乳動物の種類によりそれぞれ異なる構造の糖鎖を有するが、本発明における「モノ

クローナル抗体」は該糖鎖の構造差異により限定されるものではなく、あらゆる哺乳動物由来のモノクローナル抗体をも包含するものである。ファージディスプレイでつくられるモノクローナル抗体、さらに、例えばヒトイムノグロブリン遺伝子を組み込むことにより、ヒト型抗体を産生するように遺伝子工学的に作出されたトランスジェニックマウスを用いて得られるヒト型モノクローナル抗体、あるいは、遺伝子組換え技術により、ある哺乳動物由来のモノクローナル抗体の定常領域 (Fc領域) をヒトモノクローナル抗体のFc領域と組み換えたキメラモノクローナル抗体、さらには抗原と相補的に直接結合し得る相補性決定部位 (CDR: complementarity-determining residue) 以外、全領域をヒトモノクローナル抗体の対応領域と組換えたヒト化モノクローナル抗体も本発明の「モノクローナル抗体」に包含される。

【0018】本発明において「抗体の一部」とは、少なくとも一つの可変領域を含有する抗体フラグメントの意であり、前述の本発明における抗体、好ましくはモノクローナル抗体の一部分の領域を意味し、具体的にはFv、F(ab')₂、Fab'あるいはFabを指す。ここで、「F(ab')₂」及び「Fab'」とは、イムノグロブリン (モノクローナル抗体) をタンパク質分解酵素であるペプシンあるいはパパイニン等で処理することにより製造され、ヒンジ領域中の2本のH鎖間に存在するジスルフィド結合の前後で消化されて生成される抗体フラグメントを意味する。例えば、IgGをパパイニンで処理すると、ヒンジ領域中の2本のH鎖間に存在するジスルフィド結合の上流で切断されてVL (L鎖可変領域) とCL (L鎖定常領域) からなるL鎖、及びVH (H鎖可変領域) とCH₁ (H鎖定常領域中のγ1領域) とからなるH鎖フラグメントがC末端領域でジスルフィド結合により結合した相同な2つの抗体フラグメントを製造することができる。これら2つの相同な抗体フラグメントをそれぞれFab'という。また、IgGをペプシンで処理すると、ヒンジ領域中の2本のH鎖間に存在するジスルフィド結合の下流で切断されて前記2つのFab'がヒンジ領域でつながったものよりやや大きい抗体フラグメントを製造することができる。この抗体フラグメントをF(ab')₂という。

【0019】モノクローナル抗体の細胞への結合活性は、例えば、抗体により染色したマクロファージ細胞株をフローサイトメトリーやELISA法などを用いて解析するなどの方法により検出することができる。

【0020】G-CSFの産生誘導活性を検出するためのマクロファージ細胞株は、レポーター遺伝子を導入したベクターを宿主細胞 (マクロファージ細胞株) に導入することにより達成される。レポーター遺伝子をプラスミドベクター、ファージベクター、レトロウイルスベクター等のベクターに導入し、細胞を形質転換して、あるいはインビトロパッケージング後、宿主細胞に形質移入 (トランスフェクト) することによりレポーター遺伝子を安

定に保持した形質転換細胞を作製する。

【0021】ここで用いられるプラスミドベクターとしては、宿主細胞内で複製保持されるものであれば特に制限されず、また用いられるファージベクターとしても宿主細胞内で増殖できるものであればよい。常法的に用いられるベクターとしてpUC119、λgt10、λgt11、ピッカジーン エンハンサー ベクター2、pMC1 neo PolyA等が例示される。

【0022】プラスミドにG-CSF遺伝子の5'制御領域を組み込む方法としては、例えば、「Maniatis, T. ら, モレキュラークロニング, ア・ラボラトリー・マニュアル (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, second edition), Cold Spring Harbor Laboratory, 1.53(1989)」に記載の方法などが挙げられる。また、ファージベクターにG-CSF遺伝子の5'制御領域を組み込む方法としては、Hyunh, T. V. らの方法 (Hyunh, T. V., DNA Cloning, a practical approach, 1, 49(1985)) などが挙げられる。簡便には、市販のライゲーションキット (例えば、宝酒造製等) を用いることもできる。このようにして得られる組換えプラスミドやファージベクターは、原核細胞 (例えば、E. coli HB101, DH5またはMC1061/P3等) 及び/または真核細胞 (J774.1, PU5-1.8, RAW264.7, ST2) 真核細胞の各種の適当な宿主細胞に導入する。

【0023】プラスミドを宿主細胞に導入する方法としては、「Maniatis, T. ら, モレキュラークロニング, ア・ラボラトリー・マニュアル (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, second edition), Cold Spring Harbor Laboratory, 1.74(1989)」に記載の塩化カルシウム法または塩化カルシウム/塩化ルビジウム法、エレクトロポレーション法、エレクトロインジェクション法、PEGなどの化学的な処理による方法、遺伝子銃などを用いる方法などが挙げられる。また、ファージベクターを宿主細胞に導入する方法としてはファージDNAをインビトロパッケージングした後、増殖させた宿主細胞に導入する方法等が例示される。インビトロパッケージングは、市販のインビトロパッケージングキット (例えば、ストラタジーン社製、アマシャム社製等) を用いることによって簡便に行うことができる。

【0024】ベクターは、簡便には当業界において入手可能な組換え用ベクター (プラスミドDNAおよびバクテリアファージDNA) に所望の遺伝子を常法により連結することによって調製することができる。用いられるベクターとしては、具体的には、大腸菌由来のプラスミドとして、例えば、pBR322、pBR325、pUC12、pUC13などが、酵母由来プラスミドとして、例えば、pSH19、pSH15などが、枯草菌由来プラスミドとして、例えば、pUB110、pTP5、pC194などが例示されるがこれらに制限されない。また、ファージとしてはλファージなどのバクテリオファージが、さらにレトロウイルス、ワクシニヤウイルス、核多角体ウイルスなどの動物や昆虫のウイルス [pVL

1393 (インビトロゲン社製)]などが例示されるがこれらに制限されない。

【0025】 所望のタンパク質を生産する目的においては、特に、発現ベクターが有用である。発現ベクターとしては、原核細胞および/または真核細胞の各種の宿主細胞中で所望の遺伝子を発現し、所望のタンパク質を生産する機能を有するものであれば特に制限はないが、例えば、大腸菌 (pGEX-5X-1)、またはSV-40由来の発現ベクターなどが好ましい。

【0026】 形質転換体は、所望の発現ベクターを宿主細胞に導入することにより調製することができる。用いられる宿主細胞としては、本発明の発現ベクターに適合し、形質転換されうるものであれば特に制限はなく、本発明の技術分野において通常使用される天然細胞、または人工的に樹立された組換え細胞など種々の細胞を用いることが可能である。例えば、細菌 (エシェリキア属菌、バチルス属菌)、酵母 (サッカロマイセス属、ピキア属など)、動物細胞、昆虫細胞などが挙げられる。

【0027】 特に、大腸菌または動物細胞が好ましく、具体的には、大腸菌 (DH5, HB101等)、マウス由来細胞 (COP, L, C127, Sp2/0, NS-1またはNIH3T3等)、ラット由来細胞、ハムスター由来細胞 (BHKおよびCHO等)、サル由来細胞 (COS1, COS3, COS7, CV1およびVelo等) およびヒト由来細胞 (Hela, 2倍体線維芽細胞に由来する細胞、ミエローマ細胞およびNamalwa等) などが例示される。その他、動物細胞としてはマクロファージ、ストローマ細胞、単球、Tリンパ球、繊維芽細胞、血管内皮細胞、若くはそれらの動物細胞から樹立した培養細胞株などが例示される。

【0028】 宿主細胞として細菌、特に大腸菌を用いる場合、一般に発現ベクターは少なくとも、プロモーター-オペレーター領域、開始コドン、所望の遺伝子、終止コドンおよび複製可能単位から構成される。宿主細胞として酵母、動物細胞または昆虫細胞を用いる場合には、一般に発現ベクターは少なくとも、プロモーター、開始コドン、所望の遺伝子、終止コドンを含んでいることが好ましい。またシグナルペプチドをコードするDNA、エンハンサー配列、所望遺伝子の5'側および3'側の非翻訳領域、スプライシング接合部、ポリアデニレーション部位、選択マーカー領域または複製可能単位などを適宜含んでもよい。また、目的に応じて通常用いられる遺伝子増幅遺伝子 (マーカー) を含んでもよい。

【0029】 本発明のベクターにおいて、好適な開始コドンとしては、メチオニンコドン (ATG) が例示される。また、終止コドンとしては、常用の終止コドン (例えば、TAG, TGAなど) が例示される。

【0030】 複製可能単位とは、宿主細胞中でその全DNA配列を複製することができる能力をもつDNAをいい、天然のプラスミド、人工的に修飾されたプラスミド (天然

のプラスミドから調製されたDNAフラグメント) および合成プラスミド等が含まれる。好適なプラスミドとしては、E. coliではプラスミドpBR322、もしくはその人工的修飾物 (pBR322を適当な制限酵素で処理して得られるDNAフラグメント) が、酵母では酵母2μプラスミド、もしくは酵母染色体DNAが、また哺乳動物細胞ではプラスミドpRSVneo ATCC 37198、プラスミドpSV2dhfr ATCC 37145、プラスミドpdBPV-MMTneo ATCC 37224、プラスミドpSV2neo ATCC 37149、プラスミドpME18S等があげられる。

【0031】 エンハンサー配列、ポリアデニレーション部位およびスプライシング接合部位については、例えば、それぞれSV40に由来するもの等、当業者において通常使用されるものを用いることができる。

【0032】 選択マーカーとしては、通常使用されるものを常法により用いることができる。例えばテトラサイクリン、アンピシリン、またはカナマイシンもしくはネオマイシン等の抗生物質耐性遺伝子などが例示される。

【0033】 遺伝子増幅遺伝子としては、ジヒドロ葉酸レダクターゼ (DHFR) 遺伝子、チミジンキナーゼ遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、グルタミン酸合成酵素遺伝子、アデノシンデアミナーゼ遺伝子、オルニチンデカルボキシラーゼ遺伝子、ヒグロマイシン-B-ホスホトランスフェラーゼ遺伝子、アスパラートトランスカルバミラーゼ遺伝子等を例示することができる。

【0034】 発現ベクターは、少なくとも、上述のプロモーター、開始コドン、所望の遺伝子、終止コドン、およびターミネーター領域を連続的かつ環状に適当な複製可能単位に連結することによって調製することができる。またこの際、所望により制限酵素での消化やT4DNAリガーゼを用いるライゲーション等の常法により適当なDNAフラグメント (例えば、リンカー、他のレストリクシオンサイトなど) を用いることができる。

【0035】 本発明に用いた発現ベクターの宿主細胞への導入 [形質転換 (形質移入)] は従来公知の方法を用いて行うことができる。例えば、細菌 (E. coli, Bacillus subtilis等) の場合は、例えばCohenらの方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972)]、プロトプラスト法 [Mol. Gen. Genet., 168, 111 (1979)] やコンピテント法 [J. Mol. Biol., 56, 209 (1971)] によって、Saccharomyces cerevisiaeの場合は、例えばHinnenらの方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1927 (1978)] やリチウム法 [J. Bacteriol., 153, 163 (1983)] によって、動物細胞の場合は、例えばGrahamの方法 [Virology, 52, 456 (1973)]、昆虫細胞の場合は、例えばSummersらの方法 [Mol. Cell. Biol., 3, 2156-2165 (1983)] によってそれぞれ形質転換することができる。

【0036】 上記のごとく調整した宿主細胞からの所望

タンパクの産生確認試験は、以下のように行えばよい。
つまり、上記のごとく調整した宿主細胞には、上記ベクターの所望遺伝子部位にマーカー遺伝子を導入し、宿主細胞からマーカーとなるタンパクを産生させる。本発明抗体が、宿主細胞と結合することにより、産生したタンパクを検出すればよい。

【0037】ここで、所望遺伝子部位に用いるレポーター遺伝子としては、ルシフェラーゼ遺伝子、 β -ガラクトシダーゼ、グリーンフルオレッセンスプロテイン (GFP)、 β -ラクタマーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) などが挙げられる。

【0038】産生したタンパクを検出する方法としては、タンパクがルシフェラーゼの場合は、ルシフェラーゼアッセイ法を、タンパクがクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) の場合はCATアッセイ法を用いることができる。タンパクがグリーンフルオレッセンスプロテイン (GFP) 等の場合は蛍光測定法を用いることができる。

【0039】調製された本発明のモノクローナル抗体は、例えば、血液成分の白血球の一種である好中球が関与する疾患の検出や治療などに利用することが可能である。

【0040】本発明の抗体は、抗ガン剤の副作用としての好中球減少症や骨髄移植後の好中球減少症の治療及び再生不良性貧血の診断、予防および治療などのために用いることが可能である。本発明の抗体は通常、全身または局所的に、一般的には非経口の形で投与することができる。非経口投与の内でも特に好ましくは静脈内投与である。

【0041】投与量は、年齢、性別、体重、症状、治療効果、投与方法、処理時間、投与するもの（全長のタンパク質、該タンパク質の一部を置換、欠失、挿入したタンパク質、該タンパク質の抗体の種類）などにより異なるが、成人一人当たり、一回につき10 μ gから100mgの範囲で、一日一回から複数回非経口投与することができる。投与量は種々の条件により変動するため、上記投与量より少ない量で十分な場合もあり、また上記の範囲を越える投与量が必要な場合もある。本発明による非経口投与のための注射剤としては、無菌の水溶性または非水溶性の溶液剤、懸濁剤、乳濁剤などを包含する。水溶性または非水溶性の溶液剤、懸濁剤としては、一つまたはそれ以上の活性物質が、少なくとも一つの不活性な希釈剤として混合される。水溶性の希釈剤としては、例えば注射用蒸留水および生理食塩水などが挙げられる。非水溶性の希釈剤としては、例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油のような植物油、エタノールのようなアルコール類などが挙げられる。このような組成物は、さらに防腐剤、湿潤剤、乳化剤、分散剤、安定化剤（例えばアルギニン、アスパラギン酸など）のような補助剤を含んでいてもよい。これらはバクテリア保

留フィルターを通す濾過、殺菌剤の配合または照射によって無菌化される。これらはまた無菌の固体組成物を例えば凍結乾燥法などによって製造し、使用前に無菌の注射用蒸留水または他の溶媒に溶解して使用することもできる。非経口投与のためのその他の組成物としては、一つまたはそれ以上の活性物質を含み、常法により処方される外用液剤、腸溶内投与のための坐剤およびペッサリなどが含まれる。

【0042】以下、本発明を実施例によりさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

【実施例】

[実施例1] モノクローナル抗体の調製

以下に述べる抗体産生ハイブリドーマの調製は、ケーラー (Kohler) らの方法 (Blood, 第81巻、101-111ページ、1993年、大森ら) を参照しながら行い、また、モノクローナル抗体の調製は神奈木らの方法 (Handbook of Experimental Immunology, 第4巻、117.21-117.21ページ、1986年) を参照しながら行った。まず、マウスマクロファージ細胞株RAW264.7を免疫感作抗原として、該抗原をMRL/lprマウスに0日目、7日目、14日目および28日目（それぞれ10⁷個/匹）という間隔及び量で腹腔内投与した。最後の免疫感作から3日後に該マウスの脾臓を採取し、常法によりマウスミエローマ細胞PAI (Stocker, J. W. et al. Res. Disclosure, 217:155(1982)) と融合させた。得られたハイブリドーマの各々の培養上清を、免疫原であるマクロファージ細胞に添加し、ELISA法でマクロファージ細胞に結合する抗体を産生するハイブリドーマを選別した。

30 【0043】[実施例2] マクロファージ細胞のG-CSF産生確認試験に使用するベクターの調整

実施例1で調製したモノクローナル抗体のマクロファージ細胞に及ぼす効果を以下の方法で解析した。レポーター遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子を用いたピッカジーシステム (Picagene System (和光純薬工業 (株) 社製)) を使用した。ピッカジー エンハンサー ベクター2 (和光純薬工業 (株) 社製) を用いてXho I サイトからNeo I サイトにかけて、G-CSFプロモーター遺伝子を挿入し、その下流にG-CSF遺伝子の代りにルシフェラーゼ遺伝子を結合させ、さらにSV40の下流のSal I サイトにpMC1Neo Poly Aから切り出したネオマイシン抵抗性遺伝子を挿入したPicaGCSFneoベクターを構築した。その結果を図1に示す。

40 【0044】[実施例3] ベクターのマクロファージへの導入

次に、マウスマクロファージ細胞株RAW264.7に上記ベクターを以下の方法で導入した。対数増殖期のRAW264.7細胞株を収穫し、10%ウシ胎児血清 (FCS; Bio-Whittaker社製) 及び非必須アミノ酸 (NEAA) を含むイーグル培地で一回洗浄し、同培地中に2 \times 10⁷個/mlの濃度で再懸

濁した。上記細胞懸濁液250 μ l (5 \times 10⁶個)にキャパシタンス エクステンダーを付けたバイオラッド ジーン パルサーを用いて、300V、960 μ Fで0.4cm エレクトロポレーションキュベット (electroporation cuvette) 中で塩化セシウムで精製したPicaGCSFneoプラスミドDNA10 μ gを室温にてエレクトロポレーション法を用いて導入した。

【0045】[実施例4] クローンの選抜

形質転換して48時間後、得られた細胞をジェネチシン (ネオマイシンの一種) 200 μ g/mlを含む培地で処理し、コロニーを形成した細胞群を10乃至15日後、選抜した。50個のジェネチシン抵抗性クローンの内43個のクローンがリポポリサッカライド (LPS) で処理し検出可能なルシフェラーゼ活性を示した。そのなかでも、一つのクローンが極めて高いルシフェラーゼ活性を示し、RAW264.7クローン27-3と命名した。

【0046】なお、ルシフェラーゼ活性が実際のG-CSFmRNAの発現を反映していることは以下の実験で確認した。18時間LPS10 μ g/mlで処理したRAW264.7クローン27-3細胞 (1.5 \times 10⁷個) を、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄した。全RNAを1%ホルムアルデヒド・アガロース・ゲル上で電気泳動させ、ナイロンフィルターに移し、³²PラベルマウスG-CSFのcDNAをプローブとしてノーザンブロット解析を行った。コントロールとしてフィルターを³²Pラベル β -アクチンcDNAでハイブリダイゼーションを行った。上記実験によって、ルシフェラーゼ活性が実際のG-CSFmRNAの発現を反映していることが確認された。

【0047】[実施例5] 抗体のマクロファージ細胞のG-CSF産生作用

G-CSF産生能を有する抗体をルシフェラーゼを指標に選別した。96ウェルマイクロプレートに、1ウェル当たり5 \times 10⁴個のマクロファージ細胞株を播き、37 $^{\circ}$ Cで24時間培養し、実施例1で選別したマクロファージ細胞に結合する抗体産生ハイブリドーマの培養上清液を添加し、さらに、37 $^{\circ}$ Cで18時間培養した。ルシフェラーゼ測定は、Picagene Luminescence Kit (和光純薬社製) を用いて手引き書に従った。ルシフェラーゼ活性測定は、CT9000ルミノメーター (Dia-Iatron社製) で測定し、Bicinchoni*

*nic Acid (BCA) アッセイによりタンパク濃度を測定し、タンパクの μ g当たりの相対発光単位 (Relative light units(RLU)) で表示した。

【0048】G-CSF産生能を有するハイブリドーマクローンを7クローン取得し、その中で最も活性の強いハイブリドーマクローンを「3-4H7」と命名した。なお、このハイブリドーマは通産省工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託した (寄託番号: FERM BP-6103)。また、マウスモノクローナル抗体アイソタイプ同定キット (Amersham社製) を用いてアイソタイプを同定したところ、上記ハイブリドーマクローンからモノクローナル抗体 (寄託番号: FERM BP-6103から調製されるものを「3-4H7抗体」と称する) のイムノグロブリンクラスはIgMであった。さらに、E-G-SEP IgM精製キット (ファルマシア社製) を用いて「3-4H7抗体」を精製し、96ウェルマイクロプレートに1ウェル当たり5 \times 10⁴個のマクロファージ細胞株を播き、37 $^{\circ}$ Cで24時間培養し、0, 3.75, 7.5, 15, 30, 60 μ g/mlの濃度で添加し、37 $^{\circ}$ Cで18時間培養した。その結果を図2に示す。

【0049】図2から、本願発明抗体は、抗体濃度依存的にマクロファージ細胞株RAW264.7クローン27-3からG-CSFを産生する作用を有することが確認された。

【0050】

【発明の効果】本発明の抗体は、G-CSFの産生能を有し、抗ガン剤の副作用としての好中球減少症や骨髄移植後の好中球減少症の治療及び再生不良性貧血の治療に効果を示す。G-CSFの産生能を有することにより、日和見感染症をはじめとする各種感染症性疾患の予防又は治療に利用できる。また、該抗体を産生するハイブリドーマは、多大な有用性が期待される本発明の該抗体を生産する際の重要かつ必須の細胞である。

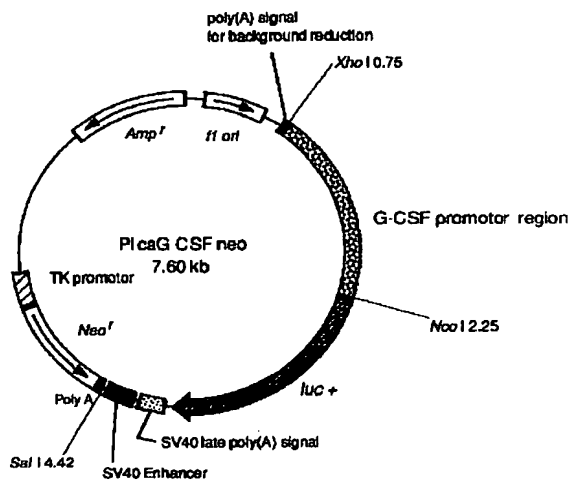
【0051】

【図面の簡単な説明】

【図1】「3-4H7抗体」によるマクロファージ細胞のG-CSF産生確認試験に使用するベクターの遺伝子地図である。

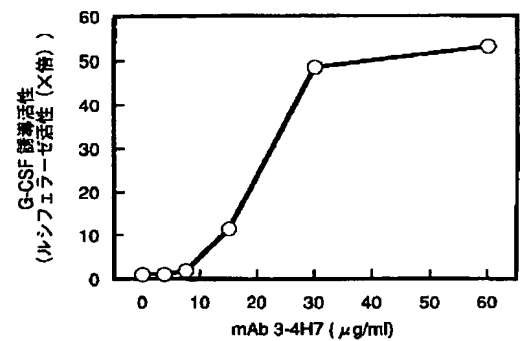
【図2】「3-4H7抗体」のマクロファージ細胞株に及ぼす効果を示した図である。

【図1】



G-CSF 産生確認試験に使用したベクターの構築

【図2】



3-4H7 抗体による RAW264.7 からの G-CSF 産生誘導

フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁶

識別記号

F I

// C 1 2 N 15/02

C 1 2 N 15/00

C

(C 1 2 N 5/10

C 1 2 R 1:91)

(C 1 2 P 21/08

C 1 2 R 1:91)

(72) 発明者 西 義介

神奈川県横浜市青葉区梅が丘 6-2 経営
企画部青葉台駐在內